Yeast two-hybrid 方法筛选 VISA 相互作用蛋白

Screening of VISA Interacting Proteins by Yeast Two-hybrid System[1]

WANG Dan-dan1，2 CHEN Tian1，2 XU Liangguo1，2＊

（1 江西师范大学功能有机小分子教育部重点实验室，2 江西师范大学生命科学学院 南昌 330022；＊通讯作者）

摘要 病原微生物感染对人类健康构成巨大威胁，先天免疫系统是生物体在长期进化过程中建立起来的天然保护系统。 VISA （ MAVS, CARDIF, IPS-1[1,2,3]）是连接胞浆 dsRNA 受体 RIG-I 与下游信号转导通路的一个接头蛋白，研究结果表明 VISA 无论在 TLR3 非依赖的或者 TLR3 介导的抗病毒 IFN 信号途径中都具有关键作用，但目前对 VISA 信号转导的详细机制还不十分清楚。更多 VISA 相互作用蛋白的发现以及它们之间的作用机制的研究能完善我们对 VISA 参与的信号转导机制的认识。本实验利用酵母双杂交系统，用 VISA 蛋白的全长做诱饵（ Bait)筛选 293 T 细胞 cDNA 表达文库，并结合免疫共沉淀实验，双荧光素酶报告基因系统验证筛选到的阳性克隆和 VISA 作用的真实性。通过酵母双杂交系统成功筛选到 *Sec13L1* 候选基因并验证了其与 VISA 的全长蛋白相互作用，在 293 T 细胞中过表达这个基因,研究结果显示 *Sec13L1* 过表达能促进 VISA 对 IFNβ 的诱导，并存在剂量效应。

关键词：酵母双杂交系统；先天免疫； VISA ； Sec13L1

Abstract： The infection of a virus is a great threat to host; the innate immune system is set up as the natural protection system of an organism. VISA（also know as MAVS, CARDIF, IPS-1）, is an critical adapter protein required for virus-triggered IFN-β signaling, recruiting RIG-I-like receptors(including RIG-I and MDA5) and downstream signaling proteins to VISA signalosome at mitochondria upon virus infection, leading to activation of transcriptional factor IRF3 and NF-κB, and resulting in the induction of IFNs and other inflammatory cytokines. However, the mystery of VISA for the antiviral function is still not completely figured out. In this study, we use VISA as bait for screening a human 293T cell cDNA library in a yeast two-hybrid screening,

[1] . VISA 介导的细胞抗病毒信号转导的深层研究(31370876)；TRAF7 介导的细胞抗病毒信号转导功能和机理研究(31570876)；抗病毒先天免疫信号通路的深入研究(20143ACB20004)

通讯作者邮箱：xuliangguo163@163.com

trying to identify the interacting proteins of VISA. Then, coimmunoprecipitation experiments were carried out to verify the association between VISA and candidates proteins screened from the yeast two-hybrid system assay. It is indicated that Sec13L1 associated with VISA. Overexpression of Sec13L1 in 293 cells facilitated to enhance the activation of IFNβ promoter induced by VISA and virus infection in a dose-dependent manner.

Key Words: yeast two-hybrid system; Innate immune; VISA ； Sec13L1

中图分类号：Q291

1 引言

先天免疫系统是机体抵抗入侵病原体的第一道防线，先天免疫对入侵病原体的检测及随后特异性免疫的启动都是至关重要的，在机体抗感染的过程中发挥重要的防御功能。 RLRs (包括 RIG-I, MDA5 等)存在于细胞浆内，是监测细胞内病毒 RNA 的感应器。研究结果表明，VISA 是连接 RIG-I 与下游信号转导通路的一个接头蛋白。 VISA 定位在线粒体外膜上,由 540 个氨基酸组成，具有 3 个主要功能域： N 端的 CARD 域(CARD domain: aa 10-77),中间的脯氨酸丰富区域(proline-rich region: aa 107-173)和 C 端的跨膜域(transmembrane domain: aa 514-535), 同时还存在 3 个 TRAF (TRAF2, TRAF3, TRAF6)相互作用结构域(TRAF interacting motifs)。病毒感染细胞后， VISA 的 CARD 域能与 RIG-I 和 MDA5 暴露的 CARD 域相互作用，通过这种 CARD 域之间的相互作用，VISA 被招募到 RIG-I 分子上，然后通过 VISA 招募下游不同的信号转导分子[1,2]。 CARD 域对 VISA 转导下游通路，激活下游的 NF-κB 和 IRF3 等转录因子起非常重要的作用,实验证实缺少 CARD 域的 VISA 短截体不能有效地进行下游信号转导。在细胞内过表达缺少跨膜域的 VISA 短截体也不能进行信号转导，而将 VISA 分子 的跨膜域换成 BCL2 跨膜域的嵌合体 VISA 具有和野生型一样的信号转导功能，这说明 C 端的跨膜域对于 VISA 蛋白正确定位在线粒体外膜上，对 VISA 进行有效的信号转导是必需的[2]。研究表明， VISA 是涉及 IFNβ 信号通路关键的接头分子。 VISA 对于 RIG-I 介导的信号通路具有不可或缺的作用， VISA 对于非 TLR3 依赖的信号通路是不可缺少的，同时 VISA 也参与 TLR3 激发信号通路，但不参与 TLR4 和 TNF 激发的信号通路[1]。

综上所述，对 VISA 抗病毒信号通路的研究在近年来取得了比较大的进展，

但对于 VISA 信号转导的详细机制还不十分清楚，还有一些问题需要解决。要了解 VISA 信号转导通路中更多的细节，更全面了解 VISA 的作用机理，一个最好的方法就是继续寻找新的与 VISA 相互作用蛋白，因此本研究用 VISA 蛋白的全长做诱饵（ Bait)，利用酵母双杂交系统来筛选 293 T 细胞 cDNA 表达文库，以期筛选到新的 VISA 相互作用蛋白，通过免疫共沉淀实验和双荧光素酶报告系统在 293 T 细胞中验证筛选到的阳性克隆与 VISA 相互作用的真实性。通过对 VISA 与新的相作蛋白的作用机理研究能进一步阐明 VISA 在抗病毒信号通路中的作用细节。

2 材料与方法

2.1 材料

酵母 AH109 由武汉大学舒红兵教授惠赠；诱饵载体 pGBT9 由本实验室保存；由 pACT2 载体构建的 293 T 细胞 cDNA 筛选文库购自 Clontech 公司；用于转化的 ssDNA (Salmon Sperm DNA，鲑鱼精子 DNA)购自上海索莱宝生物科技有限公司； YPD Broth 全营养培养基、 CSM-TRP 缺陷培养基、CSM-TRP-LEU 缺陷培养基、CSM-HIS-LEU-TRP 缺陷培养基以及 YNB 无氨基酸酵母氮源均购自 MP Blomedlcals 公司；酵母双杂交用琼脂粉（ Agar ）购自 Fisher Scientific 公司；PEG（分子量为 3350）、3-AT（ 3-Amino-1,2,4-triazole）、LiAc、 Tris·base、 EDTA、 DMSO、 D-（+）-Glucose 及筛选试验中用到的其它常用生化试剂购自 Sigma 公司；酵母质粒提取试剂盒（ Yeast Plasmid Kit）购自 OMEGA 及索莱宝生物科技有限公司； DNA 测序由华大基因公司完成。哺乳动物细胞表达载体 pRK5-Flag、 pRK5-HA 由本实验室构建并保存；作为 PCR 模板的 cDNA 文库购自 Clontech 公司；引物由上海生工公司合成； Taq DNA 聚合酶混合液（ 2xTaq plus PCR Master Mix）琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒小提试剂盒均购自天根公司；琼脂糖（ Agarose ）购自 BIOEXPRESS 公司； Endo-Free 质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司；限制性内切酶均购自 NEB(New England Biolabs)公司； T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司及 TaKaRa 公司； LB 琼脂培养基（LB Agar）购自 Solarbio 公司； LB 肉汤培养基（ LB Broth）购自 GENEray 公司；用于阳性克隆筛选的氨苄青霉素（Ampicillin）购自 Sigma 公司；感受态细胞（ DH5α ）由本实验室参照《分子

克隆实验指南》第四版（J.萨姆布鲁克等著，2012）的有关实验方法制备。人胚肾 293 T 细胞（ Human embryo kidney 293）由武汉大学舒红兵教授惠赠；细胞培养用的 DMEM 培养基、小牛胎儿血清 FBS （Fetal bovine serum）、0.05% 及 0.25% 胰酶液（ Trypsin ）以及配制双抗的青霉素（ Penicillin ）和链霉素（ Streptomycin ）均购自 GIBCO 公司； 100mm 细胞培养皿、一次性移液管以等均购自 Greiner 公司；细胞标准磷酸钙转染中 2x HBS （ PH7.12）和 2.5M CaCl2 试剂所需药品购自 Sigma 公司。实验所用硝酸纤维素膜（ NC 膜）购自 Millipore 公司；磁珠 ProteinG-Sepharose 购自 GE healthcare 公司；免疫共沉淀所用抗 Flag 标签（ anti-Flag）单克隆抗体购自 Sigma 公司；脱脂奶粉购自 LabScientific 公司； Western blot 中所用一抗为抗 Flag 标签（ anti-Flag ）、抗 HA 标签（ anti-HA ）单克隆抗体，均购自 Sigma 公司；所用二抗为 HRP 偶联标记的羊抗小鼠 IgG （ anti Mouse IgG），购自 PIERCE 公司； Immun-Star HRP 化学发光试剂盒（Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit)购自 Bio-Rad 公司，实验结果由化学发光成像系统扫描获得。萤火虫荧光素酶报告基因质粒 IFNβ-Luc 购自 Strategene 公司；海肾荧光素酶报告基因质粒 pRL-TK-Renilla 购自 Promega 公司；仙台病毒（ Sendai virus, SeV）由武汉大学舒红兵教授惠赠；双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System)购自 Promega 公司。

2.2 方法

2.2.1 构建 pGBT9- VISA 诱饵载体

用 SalI/ NotI 酶切 pRK5-Flag- VISA 质粒,利用胶回收试剂盒回收小片断。用 SalI/ NotI 酶切 pGBT9,利用胶回收试剂盒回收大片断 T4DNA 连接酶连接大、小片段并转化大肠杆菌 DH5 α。用 TIANGEN 质粒小提试剂盒抽提质粒从 DH5 α中抽提质粒 pGBT9- VISA。

2.2.2 酵母菌转化以及阳性克隆挑选

利用 PEG/ LiAc 法将 1ug pGBT9- VISA 和 100μg ssDNA 转化 AH109 酵母感受态细胞 ,Trp- 缺陷固体培养基 30 ℃培养 2 d。长出的克隆为 AH109[p GBT9- VISA]。 挑取 AH109[p GBT9- VISA]菌株制作感受态细胞, PEG/ LiAc 法大规模转入 10 mg 293 T ds cDNA 和 100 mg ssDNA，取 1/1000 体积的菌体

混合液涂布于 Leu^-/ Trp^- plate 培养 2d 检测转化效率，其他菌体混合液 His^-/ Leu^-/ Trp^-/3-AT plate （3-AT 浓度 2.5 mM） 30 ℃培养 7-10 d。挑取克隆于 2ml Trp^- medium 220 rpm 摇床培养 1-2 d，用 YEAST 小提试剂盒抽提质粒。

2.2.3 PCR 产物测序及生物信息学初步分析

用 GAD 通用引物对抽提到的各酵母克隆的质粒进行 PCR ，PCR 反应条件是 94 ℃，4 min ;94 ℃ 30s ,57 ℃ 30 ,72 ℃ 1 min , 共 35 个循环 ;72 ℃延伸 5 min ,4 ℃ ∞。回收 PCR 产物并送华大基因测序，对测序结果进行 NCBI BLAST 数据库进行比对并对比对结果进行分析。

2.2.4 候选基因全长克隆到哺乳动物细胞表达载体 pRK5-Flag 上

利用分子克隆技术将筛选到的候选基因全长克隆到带 Flag 标签的哺乳动物细胞表达载体 pRK5-Flag 上。根据 NCBI 上已发表的候选基因的序列及 pRK5 表达载体多克隆位点设计 PCR 引物。我们于 5′ 端引物引入 SalI 限制性酶切位点 GTCGAC 序列， 3′ 端引物引入 NotI 限制性酶切位点 GCGGCCGC 序列，将设计的引物序列提交给上海生工合成。从人 293 T 细胞 cDNA 文库中 PCR 扩增得到候选基因全长 CDS 序列， PCR 反应条件是 94 ℃2 min ;94 ℃ 30 ,55 ℃ 30 ,72 ℃ 1.5 min , 共 35 个循环 ;72 ℃延伸 5 min ,4 ℃ ∞。电泳后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行 PCR 产物的回收。 PCR 产物 SalI/ NotI 酶切后用 DNA 产物纯化试剂盒对酶切物进行纯化， pRK5-Flag 表达载体酶切后进行电泳，用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对大片段进行回收， T4 DNA 连接酶连接 PCR 酶切纯化产物和胶回收的载体,并转化大肠杆菌 DH5 α，于含 80 μg/ml Amp （氨苄青霉素）的 LB 平板 37℃ 培养箱倒置培养 18 h 左右。挑单克隆于 2 ml 含 80 μg/ ml Amp 的 LB 液体培养基 220 rpm 37° 摇床培养 20 h，用 TIANGEN 质粒小提试剂盒抽提质粒，利用 HindIII/ XhoI 限制性内切酶对提取的重组质粒进行酶切鉴定。鉴定正确的克隆将接种到 50ml 含 80μg/ml Amp 的 LB 液体培养基中扩大培养，并利用 Endo-Free 质粒大提试剂盒提取、纯化质粒以备其他实验用。

2.2.5 免疫共沉淀和免疫印迹实验

100 mm 培养皿培养人 293 T 细胞，采用标准磷酸钙转染法分别将构建好的质粒共转染至 293 T 细胞，于 5% CO2 的二氧化碳培养箱 37 ℃ 培养 20-24

小时后，收细胞，加入裂解液 【 20 mM Tris·HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、10 μg/mL 抑肽酶（ aprotinin）、10 μg/ mL 亮抑蛋白酶肽（ leupeptin）、饱和 Na3PO4 (1：100)、1 mM 苯甲基磺酰氟（ phenylmethylsulfonyl fluoride）、30mM NaF，PH 7.5】 400 ul， 4℃ 1 h 裂解细胞后，离心，获得的上清分两份，其中一份上清体积 350 ul，加人装有预处理过的磁珠(沉降体积约 20 μl)、20 μl 1xTBS 【1xTBS (1L)： 8 g NaCl、0.2 g KCl、3 g Tris·base， PH 7.5；】及 0.4 μg anti-Flag 单克隆抗体的 EP 管中，25 rpm、4℃ 翻转过夜。再 10000 r / min 离心 1 min，去上清 ，沉淀物用裂解液洗 2 次 ，加入 2× SDS 上样缓冲液后煮样并跑胶，再用免疫印记法检测蛋白；剩下的另一份上清体积 50 ul 直接加入等体积 2× SDS 煮样并跑胶，用免疫印记法检测蛋白。以下为免疫印迹（Western Blot）实验过程：

SDS-PAGE 电泳：配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶（10%的分离胶和 5%的浓缩胶）。在电泳槽内倒入 1xWestern Running Buffer（1xWestern Running buffer(5L)：Tris base 15.143g、Glycine 93.84g、SDS 5g，加水溶解至 5L 水），每孔上样量 20ul，蛋白 marker 取 1ul，先 80V 电泳 20min，再 150V 电泳 40min。

转膜： 转膜槽中加入 1xTransfer Buffer（Glycine 14.5g、Tris base 29g、SDS 1.85g，加水定容 4500ml 再加入甲醇 500ml），电压 200V，电流 0.35A，转膜 1.5 h。

孵一抗：转膜后，含 Tween20 的 1xTBS 水平摇床洗膜 1 min，再 5% milk 4℃ 摇床上封闭 1h，接着孵育抗体，用于免疫共沉淀的膜则是孵 anti-Flag(1:4000 比例用 5% milk 稀释)；免疫印迹的两张膜分别孵的一抗是 anti-Flag（1:4000 比例用 5% milk 稀释）和 anti-HA（1:2000 比例用 5% milk 稀释）4℃ 摇床上孵育过夜。

洗膜：含 Tween20 的 1xTBS，洗膜 4 次，每次洗膜 5min。

孵二抗：二抗是 HRP 偶联标记的羊抗鼠 anti- Mouse IgG，（1:2000 比例 5% milk 稀释）水平摇床上，孵育 1-2 小时。

洗膜：含 Tween20 的 1xTBS，洗膜 4 次，每次洗膜 5min。

显色：用 Immun-Star HRP 化学发光试剂盒进行显色，化学发光成像系统扫描显色。

2.2.6 双荧光素酶报告实验

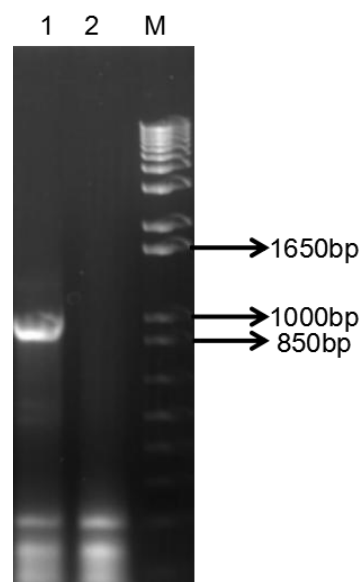
同样采用标准磷酸钙转染法将构建好的质粒、 IFNβ-Luc （萤火虫荧光素酶

报告基因质粒） 及 pRL-TK-Renilla （海肾荧光素酶报告基因质粒） 共转染至接种于 24 孔板的 293 T 细胞，于 5% CO_2 的二氧化碳培养箱 37℃ 培养，仙台病毒（ SeV ）介导的荧光素报告基因分析实验在转染 12 小时后，实验组加入仙台病毒处理细胞 12 小时，收细胞，利用单管荧光检测器检测细胞裂解液中荧光素酶活性，其它荧光素报告基因实验在转染 24 小时后，收集细胞进行荧光素酶活性检测，具体步骤参照 Promega 双荧光素酶报告基因检测试剂盒使用说明书。

3 结果

3.1 酵母双杂交筛选结果

得到阳性酵母克隆后，抽提质粒 DNA, PCR 扩增目的基因片断，测序，Genebank 分析，挑选候选基因。在本次酵母双杂交实验中筛选到了包括 Sec13L1 (NM_001136026.2) 在内的 8 个候选基因（本文未一一列出）。图 1 为 PCR 扩增产物电泳图中部分，经测序比对分析图中 1 号克隆比对结果为 Sec13L1 (NM_001136026.2)。



M： Maker，1、2 为筛选到的 1 号、2 号酵母克隆 PCR 产物

图 1 部分阳性酵母克隆 PCR 产物电泳图

Fig 1. PCR results of Y2H-clones

3.2 候选基因全长扩增以及其哺乳动物表达载体构建

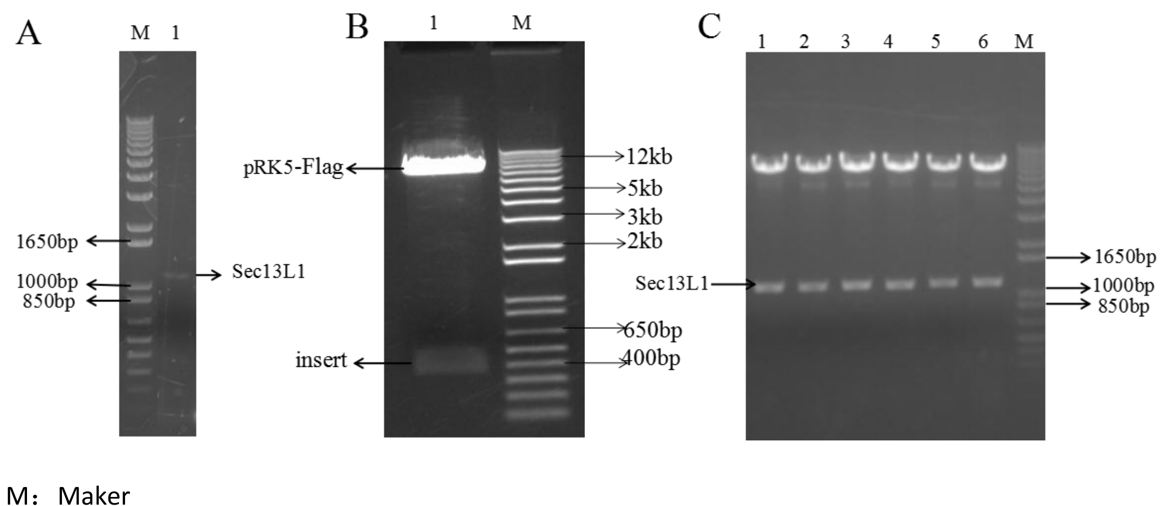
根据 NCBI 已发表的 Sec13L1 (NM_001136026.2)序列设计引物，分别在

5’ 端插入 SalI 酶切位点，3’端插入 NotI 酶切位点，引物序列如下：

5’引物：AAAGTCGACAATGAGAGAACCTGTGCTT

3’引物：AAAGCGGCCGCTCACTGCTCGTTCTGCTGGCC

利用以上设计好的 *Sec13L1* 引物从人的混合 cDNA 文库中扩增候选基因 *Sec13L1* 全长，电泳结果显示 PCR 扩增产物条带大小正确（如图 1 中 A 所示），用 SalI/ NotI 酶切消化后克隆到 SalI/ NotI 酶切回收的 PRK5-Flag 载体上并转化到大肠杆菌 DH5α 感受态中。挑单克隆 1 号~6 号，通过经HindIII /xhoI 双酶切鉴定,酶切产物电泳结果表明条带大小正确，所获得的克隆为阳性的重组质粒（如图 2 中 C 所示），送华大基因测序，结果显示所有克隆均正确，且融合区域的阅读框序列完全正确，选 1 号克隆用 Endo-Free 质粒大提试剂盒大提质粒备用。



M：Maker

图 2. 候选基因 Sec13L1 全长克隆

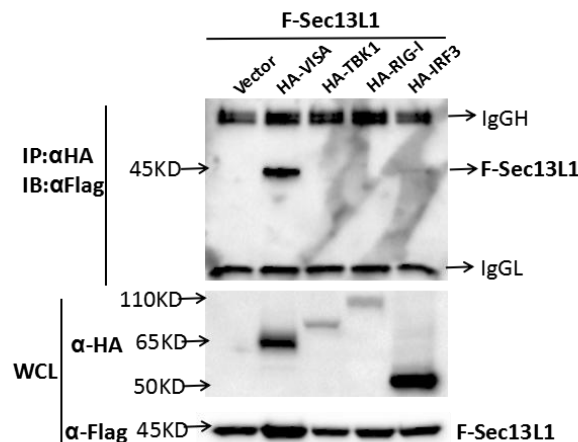
Fig 2.The Candidate gene Sec13L1 cloning

A： PCR products of the Candidate Sec13L1 ；B: Digested products of Vector pasminds PRK5-Flag-insert by SalI/ NotI ；C: Identification of the constructed vectors PRK5-Flag- *Sec13L1* by HindIII /xhoI Digesting. 1~6: Six separate monoclonal

3.3 免疫共沉淀验证蛋白间的相互作用

为了鉴定候选基因 Sec13L1 与 VISA 互作真实性，将 pRK5-Flag-Sec13L1 质粒分别与空载体 *Vector*， pRK5-HA-VISA， pRK5-HA-TBK1，pRK5-HA-RIG-I,

pRK5-HA-IRF3 各质粒共转染至 293 T 细胞，用免疫共沉淀法 (Co-immunoprecipitation, Co-IP)检测到候选基因蛋白 Sec13L1 与 VISA 蛋白相互作用。用 anti- HA 进行免疫沉淀，再用 anti- Flag 对沉淀物进行免疫印迹分析，结果显示 pRK5-Flag-Sec13L1 质粒和 pRK5-HA-VISA 质粒共转染实验组检测到条带,同时 pRK5-Flag-Sec13L1 质粒和 pRK5-HA-IRF3 质粒共转染实验组也检测到微弱条带（如图 3 中上图版所示）；对于全细胞裂解液 WCL （whole cell lysate），分别用 anti- HA 和 anti- Flag 进行免疫印迹分析（分别如图 3 中、下图版所示），结果显示各实验组共转染的质粒与结果图上表达条带相符。免疫共沉淀实验结果表明， Sec13L1 与 VISA 蛋白存在互作，此外还检测到 Sec13L1 与 IRF3 蛋白有作用，未检测到 Sec13L1 与 TBK1，RIG-I 这两个基因蛋白相互作用。



WCL: whole cell lysate

图 3 Co-IP 检测候选基因蛋白 Sec13L1 与 VISA， TBK1， RIG-I、 IRF3 四者间的相互作用

Fig 3 The interaction 0f candidate Sec13L1 and VISA， TBK1， RIG-I、 IRF3 in vestigated by immunprecipitation

293 T cells （~10^7）were transfected with the indicated plasminds (10 ug each). 24 hrs after

transfection, cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA(αHA) antibody as indicated , The immunoprecipitates were analyzed by Western blots with anti-FLAG(αF) antibody (top panels). The expression levels of the transfected proteins in the lysates were analyzed by Western blots with anti-FLAG and anti-HA antibodies(middle and bottom panels).

3.4 Sec13L1 过表达增强 VISA 对 IFNβ 启动子的激活

双荧光素酶报告基因系统是采用萤火虫和海洋腔肠荧光素酶这两个报告基因共同检测转录因子与目的基因启动子区 DNA 相互作用。之前 xu 等[1]已报道 VISA 能激活 IFNβ 启动子，本研究通过双荧光素酶报告基因系统实验发现在 293 T 中单独过表达 Sec13L1 不激活 IFNβ 启动子，而与 VISA 共转染到 293 T 细胞中时，过表达 Sec13L1 能加强 VISA 对 IFNβ 启动子的激活，并且呈剂量依赖性，随着转染 Sec13L1 量的增加， IFNβ 启动子被 VISA 激活的作用增强。实验结果显示，与只转染 VISA 的对照组相比，转染了 VISA 同时分别共转染 Sec13L1 0.2 ug、0.4 ug、0.8 ug 三组实验组与只转染 VISA 的对照组相比较，差异有显著性($P <0.05$)，且其中转染 Sec13L1 的量越多组与对照组的差异更显著；转染了 VISA 同时转染 Sec13L1 0.1 ug 与对照组的差异不显著（$P >0.05$），如图 4 所示。

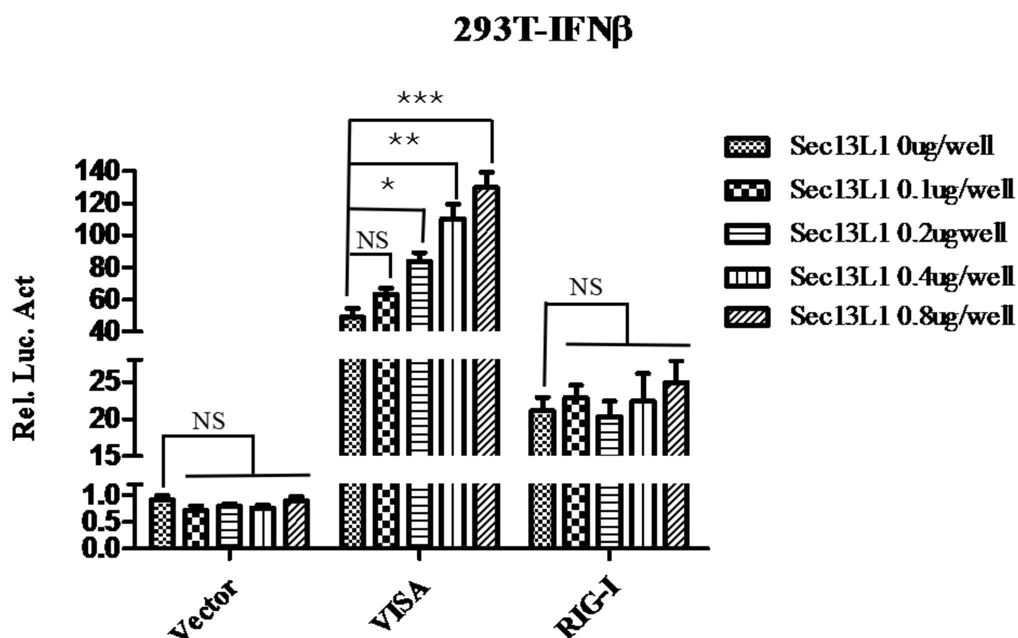


图 4. Sec13L1 过表达增强 VISA 对 IFNβ 启动子的激活

Fig4. Sec13L1 potentiates VISA-mediated activation of IFNβ promoter

293 T cells （~10^6） were transfected with the indicated plasminds（ all plasmids besides Sec13L1 0.5ug each）.IFNβ-Luc 0.1 ug each, pRL-TK-Renilla 0.05 ug each，and the indicated amount of Sec13L1. 18 hrs after transfection, luciferase assay was performed by Dual-Luciferase®Assay System （ Promega ）. NS, not significant （P >0.05）; ＊ P <0.05, ＊＊ P <0.01, ＊＊＊ P <0.001

4 讨论

通过 RIG-I 受体感知 RNA 病毒参与的复杂信号通路级联反应利用了线粒体抗病毒信号通路接头分子 VISA 蛋白来协调先天性宿主抗病毒应答，最后诱导了 IFN 和 NF-kB 信号通路诱导的抗病毒和炎症反应应答。 VISA 位于线粒体外模，和过氧化物酶体，内质网，自噬小体有关联，并且在这些位置协调了 RLRs 下游信号通路事件。VISA 不仅在诱导抗病毒和炎症反应通路中起到关键作用，它同时还和细胞凋亡，新陈代谢功能有关[4]。虽然目前已经了解 VISA 接头分子对于先天免疫应答 RNA 病毒有必要作用，但是其作用的分子机制并不是很清楚。本实验通过酵母双杂交系统，用 pGBT9- VISA 全长作为诱饵筛选 VISA 相互作用一些新的蛋白，结合免疫共沉淀和双荧光报告系统等实验验证阳性克隆与 VISA 互作。通过免疫共沉淀实验，结果显示得到的阳性克隆中 Sec13L1 能与 VISA 相互作用，双荧光报告系统研究中发现 Sec13L1 蛋白对 VISA 激活 IFNβ 启动子有正调控作用。此外，免疫共沉淀实验中还检测到 Sec13L1 与 IRF3 蛋白有作用，这说明 VISA 介导的抗病毒信号通路中涉及更复杂的蛋白质互作网络。RIG-I 类受体存在于细胞胞浆内，能识别病毒 RNA，RIG-I 类受体包括 RIG-I，MDA5 和 LGP2。病毒被 RIG-I 识别后， RIG-I 能发生构象变化从而被激活，激活的 RIG-I 转到线粒体上，与线粒体膜上接头蛋白分子 VISA 结合，RIG-I 和 VISA 结合后作为一个信号平台招募下游更多信号转导分子， IRF3 能被招募到这个信号平台上[1]。研究发现 VISA 与 Sec13L1 蛋白存在互作，Sec13L1 涉及 VISA 介导的抗病毒信号通路，这提示病毒激活 VISA 时，Sec13L1 也能被招募到 VISA 信号平台上，Sec13L1 和 IRF3 能通过 VISA 信号平台发生相互作用。对 Sec13L1 蛋白和 VISA 相互作用机理研究无疑能进一步阐明 VISA 在抗病毒信号通路中的作用细节，细化先天性抗病毒信号通路蛋白网络。

Sec13L1 蛋白属于含 WD 重复序列的 SEC13 蛋白家族，它是内质网和核孔复合物组分，对发生于内质网的囊泡运输蛋白是不可缺少的。Sec13L1 蛋白在多种细胞隔间内起作用，包括核孔复合物，COPII 包被小泡，以及在细胞核中作为一个转录调控蛋白，但目前对于 Sec13L1 作用机制并不太清楚。 Thais G. Moreira 等[5]通过研究一个低水平表达 sec13 蛋白的突变鼠模型发现体内 sec13 表达降低产生了特异性的免疫缺陷，这些突变鼠表现出巨噬细胞 MHC I 和 MHC II 低水平的表达,受刺激的 T 细胞 IFN-γ 和 IL-6 的表达降低，脾脏 IFN-γ+CD8+ T 细胞数降低，相反的是在这些突变鼠中可溶性的膜结合 TGF-β 以及血浆血球蛋白的产生量很高。此外，在这些突变鼠中 CD19+CD5-CD95+和 CD19+CD5-IL-4+ B 细胞的频数降低，而被刺激和免疫时，在这些突变鼠在所观察到的一些缺陷有所补偿。TGF-β 的表达水平维持高的状态表明在某些免疫细胞中 sec13 负调控 TGF-β 的表达以及它的抑制免疫功能。总之，sec13 调控了炎症反应中有关键作用的免疫因子的特异性表达。Y. He 等[6]通过对转染 pEGFP-N1-X（含 HBx 全长的真核质粒）和 pEGFP-N1 的两种 HepG2 的比较观察发现，转染了 pEGFP-N1-X 的 HepG2 细胞中 Sec13L1 表达增强，虽然目前还不了解其中的分子机制，但提示 Sec13L1 可能与 HBx 诱发的肝癌发生有着某种联系。本研究发现 Sec13L1 蛋白能与 VISA 互作，并增强 VISA 诱导的 IFNβ 产生，此外免疫共沉淀实验表明 IRF3 和 Sec13L1 也存在互作关系，这些结果表明 Sec13L1 参与了先天性抗病毒信号通路，而目前还没有这方面的研究报道，这对 Sec13L1 蛋白的功能也做了进一步补充。研究发现 SEC13L1 蛋白和 VISA 蛋白互作，并正调控 VISA 激活 IFNβ 启动子，这也为研究 VISA 介导的抗病毒先天免疫信号通路调控机制提供新的方向。

虽然本研究发现 Sec13L1 能通过增强 VISA 诱导的 IFNβ 产生参与调控先天性抗病毒通路，但其具体的作用机制目前并不清楚，很多问题仍待解决，比如 VISA 和 Sec13L1 在细胞中发生作用的位置，二者相互作用的分子机制，Sec13L1 在信号通路中的上下游关系等。

参考文献

1. Xu L G, Wang Y Y, Han K J, et al. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-β signaling. Mol. Cell, 2005, 19: 727–740

2. Seth R B, Sun L J, Ea C K, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-κB and IRF3. Cell, 2005, 122: 669–682

3. Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. Nature Immunol, 2005, 6: 981–988

4. Belgnaoui S M, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. Immunology , 2011, 23: 564–572

5. Moreira T G , Zhang L, Shaulovet L, et al. Sec13 Regulates Expression of Specific Immune Factors Involved in Inflammation In Vivo. Scientific Reports, 2015, 5:17655

6. He Y , Yang F, Wang F, et al. The Upregulation of Expressed Proteins in HepG2 Cells Transfected by the Recombinant Plasmid-containing HBx Gene. Scandinavian Journal of Immunology, 2007, 65: 249–256